第 38 卷第 9 期
2018 年 5 月

生 态 学 报
ACTA ECOLOGICA SINICA

Vol.38,No.9
May,2018

DOI: 10.5846/stxb201706151092
刘刚,宁宇,夏晓飞,龚明昊.高通量测序技术在野生动物食性分析中的应用.生态学报,2018,38(9):3347-3356.
Liu G, Ning Y, Xia X F, Gong M H.The application of high-throughput sequencing technologies to wildlife diet analysis.Acta Ecologica Sinica,2018,38(9):3347-3356.

高通量测序技术在野生动物食性分析中的应用

刘 刚[1,2],宁 宇[1,2],夏晓飞[3],龚明昊[1,2,*]
1 中国林业科学研究院湿地研究所,北京 100091
2 湿地生态功能与恢复北京市重点实验室,北京 100091
3 北京自然博物馆,北京 100050

摘要:食性研究是动物生态学颇受关注的一个重要内容,而食性分析方法由于受到技术和适用范围的限制,也在不断改进和更新。随着高通量测序技术的发展,该技术逐渐扩展到野生动物的食性分析,使食性分析的效率得到极大提升,并拓宽了食性分析的应用范围。尽管高通量测序应用于食性分析在数据量、灵敏度和分辨率方面的优势较为明显,但由于涉及到的步骤较多,受到的影响因素较为复杂,目前高通量测序应用于食性分析还属于研究比较薄弱的领域。概述了高通量测序技术应用于食性分析的基本流程,总结了该技术在食物组成分析、种内和种间食性关系、食物与栖息地、行为关系方面的研究动态,分析了 PCR、污染和定量分析对该技术应用性的影响,提出了相应的解决对策和建议,并对其应用前景进行了展望。

关键词:高通量测序;粪便 DNA;食性分析;种内关系;种间关系;觅食行为

The application of high-throughput sequencing technologies to wildlife diet analysis

LIU Gang[1,2], NING Yu[1,2], XIA Xiaofei[3], GONG Minghao[1,2,*]
1 *Institute of Wetland Research, Chinese Academy of Forestry, Beijing* 100091, *China*
2 *Beijing Key Laboratory of Wetland Services and Restoration, Beijing* 100091, *China*
3 *Beijing Museum of Natural History, Beijing* 100050, *China*

Abstract: Diet related studies are critical in animal ecology, and diet analysis methods have been continuously improved and updated due to technical and application limitations of the different methods. The high-throughput sequencing (HTS) technique is being used to investigate the diets of wildlife. This use has greatly improved the efficiency and broadened the range of its application to diet analysis. HTS has obvious advantages of improved dataset analysis, sensitivity, and resolution, but HTS-based diet analysis is still a weak research field because it involves many different steps and is influenced by complex factors. In this study, we summarize the general strategies adopted for diet analysis using HTS, review the current progress of this technique in analyzing diet components, and elucidate the intra-specific and inter-specific dietary relationship and the relationship between food resources and habitat and behavior. Then the influences of PCR bias, contamination, and quantitative analysis on accurate diet analysis are discussed. Ways to improve the technique are proposed, as are the prospects for the future application of this method.

Key Words: high-throughput sequencing; fecal DNA; diet analysis; inter-specific relationship; intra-specific relationship; foraging behavior

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(CAFINT2015K05); 国家自然科学基金(31500303)
收稿日期:2017-06-15; **网络出版日期**:2018-01-26

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: gongmh@ hotmail.com

食性研究是动物生态学的重要内容之一,是了解动物与环境关系及捕食者与猎物关系的前提,同时也是构建栖息地选择和利用模型、探讨取食对策和营养流动、评估物种生存状况和生态系统功能等热点问题的基础[1-4]。食性分析方法的准确性和精确性直接关系到食性相关理论的探索,同时也关乎食性结果应用于动物保护的实践。研究者对食性相关问题的研究越来越深入,食性分析方法也在不断改进和更新。传统食性方法,大多基于形态学鉴定、光谱结构差异或同位素原理,解决了很多与食性相关的生态学问题,但由于受到技术和适用范围的限制,这些方法还存在一些不足(表 1)。

表 1 各种食性分析方法的分析依据、优劣及适用范围的比较

Table 1 The comparision of different diet analysis methods in analysis basis, advantages and disadvantages, and application range

食性分析方法 Diet analysis method	分析依据 Analysis basis	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	适用/不适用范围 Suitable/unsuitable application	参考文献 References
觅食行为观察法 Feeding behavior observation	根据觅食行为和痕迹	对实验设备要求较低,无需采集食性样品	结果多为定性描述,一些动物难以跟踪	易于跟踪观察的动物,不适用夜行性或警觉性高的动物	郑荣泉和鲍毅新[5]
自助餐式利用法 Cafeteria utilization method	对人工饲喂食物的取食观察和摄食量测定	设置实验条件和控制影响因素较为灵活	饲喂的食物可能与野生条件不符	适用圈养环境的食性偏好研究	邢廷杰等[6]; Rothwell 和 Stock[7]
胃容物分析法 Stomach content analysis	对胃内食物残渣进行形态学显微鉴定	易于操作,设备简单,成本较低	损伤性,工作量大,对形态学相近的食物分辨率较低	适用于意外死亡亡个体,不适宜濒危珍稀动物	郑光美等[8] 武正军等[9]
粪便显微鉴定法 Feccal microhistological method	对粪便中食物残渣的胃内食物残渣进行形态学显微鉴定	非损伤性,取样容易,结果较可靠,成本较低	耗时费力,对消化完全或特异显微组织缺乏或形态学相近的食物鉴定效率较低	适宜于能够采集到食性样品的动物,特别适宜于濒危珍稀动物	Holechek 等[10]
饱和烷烃指纹法 Alkane fingerprint method	每种植物有独特的饱和烷烃浓度模式,内源性指示剂	能较好分析和预测动物采食量	难以确定食物组成	主要用于放牧家畜食性和摄食量研究	孙泽威等[11]
近红外反射光谱法 Near infrared spectroscopy	扫描食性样品的近红外广谱,得到食物有机分子光谱特征	操作简便易行,成本低,能分析食物偏好	难以确定食物组成	仅见于对海豹和田鼠食性偏好的研究	Kaneko 等[12] Heroldova 等[13]
稳定同位素技术 Stable isotope analyses	稳定同位素的值在捕食者和食物之间存在差异	测定步骤简单,在食物网结构和能量流动研究方面,独具优势	取样可能造成损伤,难以具体的确定食物组成	适用范围较广,但对珍稀濒危动物适用性低	王玄等[14]; 郑新庆等[15]
基于 DNA 克隆测序法 Clone based technique	对食性样品进行 DNA 提取,扩增后克隆测序	较传统形态学食性分析方法,其分类精度更高	灵敏度较低,克隆工作量大,测序成本高,通量小	适宜于能够采集到食性样品的动物(胃内容物、粪便、食团)	Braley 等[16]
基于高通量测序法 HTS based diet analysis	对食性样品进行 DNA 提取,扩增后高通量测序	工作量小、数据量大,灵敏度高,分类更精细,可半定量	成本较高;定量分析的准确性还受一些因素的影响	适宜于能够采集到食性样品的动物(胃内容物、粪便、食团),特别适宜于杂食性动物	Pompanon 等[17]

随着高通量测序技术的发展,该技术逐渐扩展到野生动物的食性分析,相关研究也在增多。高通量测序技术由于具有灵敏度高和数据通量大的特点,能在一个测序平台产生上百万条 reads,其高效性特别受到研究者的青睐(表 1)。另外,对于 PCR 来说,短片段的效率要高于长片段,而食性分析样品(粪便、食团或胃容物等),都存在不同程度的降解,较适宜短片段扩增,这意味着,高通量测序的读长范围非常适合食性分析(表

1);高通量测序以其高灵敏性,能捕获频次较低的 DNA 序列,表明少见取食的食物 DNA 也能被检测到;高通量测序产生的 DNA 序列,通过与数据库比对,可将食物的分类精确到种级别分类单元,准确性高 (表 1);基于 DNA 序列数,还可判断动物对食物取食的相对量和偏好。尽管高通量测序的优势较为明显,但由于涉及到的步骤较多,受到的影响因素较为复杂,目前高通量测序应用于食性分析还属于研究比较薄弱的领域。本文就高通量测序技术应用于野生动物食性分析进行方法概述,总结相关研究动态,评述存在的问题,并展望应用前景。

1　粪便 DNA 和高通量测序用于食性分析的流程

基于高通量测序分析动物食性的基本流程是:提取食性样品中食物残渣的 DNA→选择兼备高通用性和高分辨率的 DNA 条形码引物→PCR 扩增(引物可加相应的寡核苷酸标签)→高通量扩增子测序→获得 DNA 序列→生物信息学分析(序列筛选、比对、判定)→判断食性样品中各个 DNA 序列所对应的食物种类[17]。

1.1　样品采集、保存和 DNA 提取

目前高通量测序用于食性分析的研究中,绝大多数以粪便作为样品,有少数几项分析啮齿动物和蝗虫食性的研究采用胃内容物[18-19],还有一些研究鸟类食性的,除了用粪便外,还采用食团[20]。粪便是特别适宜于研究野生动物尤其是珍稀濒危动物的非损伤性样品,通过不同的提取方法,可从粪便中提取出目标动物 DNA、食物 DNA、微生物 DNA、寄生虫 DNA[21]。粪便的新鲜程度是决定粪便 DNA 质量的关键,直接影响 DNA 提取、PCR 和测序的效果。粪便 DNA 的质量还与粪便的采集部位有关,取粪便(粪球、粪团或粪粒)的中心、中层和外皮进行混合,能显著提高检出率,尤其是摄食量较少的食物。在取样数量方面,Erickson 等[22]对同一份粪便样品,取样 3 次分别进行高通量测序,发现样品内差异显著小于样品间差异,表明没有必要对同一份粪便样品重复取样。

粪便保存方法和 DNA 提取方法,以及二者的交互作用,决定着所采集粪便中食物残渣 DNA 的质量。保存方法和提取方法对分子标记用于保护遗传学研究的影响已有很多[23],但对食性分析的影响,目前还未见到相关研究。在食性分析中,常用的粪便保存方法有硅胶干燥法(啮齿类[24]; 棕熊[25])、缓冲液保存法(蜥蜴[26])、乙醇法(蝙蝠[27])、冷冻法(蝙蝠[28]; 蜥蜴[26]; 海豹[29]; 大鸨[30])等,也有采用两步保存法的,如乙醇和冷冻保存 (蝙蝠[31]),乙醇和硅胶保存(豹猫[32])。研究者还需综合考虑保存方法在野外的可行性,以及运输的便利性。

粪便 DNA 提取方法大多采用较为常用的商业化粪便 DNA 提取试剂盒,文献中以 QIAamp DNA Stool Mini Kit 最为常见,但也有例外[33]。研究表明,QIAamp DNA Stool Mini Kit 中的 inhibitex 含有马铃薯吸附剂,可能会在 DNA 提取时混入,导致马铃薯出现在本不取食马铃薯的动物的食谱中,因此,在分析植食性动物的食性时尽可能避免使用这种试剂盒[34]。MoBio, Epicentre, 和 Qiagen 的粪便 DNA 提取试剂盒,在小嘴乌鸦(*Corvus corone*)食性分析上效果均不如 CTAB 提取法[35]。在提取西蓝鸲(*Sialia mexicana*)的粪便 DNA 用作高通量测序时,QIAamp DNA Stool Mini Kit 的提取效率显著低于 Zymo Soil/Fecal DNA MiniPrep Kit[36]。在选择粪便 DNA 提取方法时,文献中食性相近的物种可作为参考,但还需研究者摸索出适宜的方法。

1.2　PCR 扩增和高通量测序

动物食性一般可分为动物性食物、植物性食物和杂食性。从食性分析样品中提取的 DNA 一般存在一定程度的降解,长度过长的 DNA 条形码在 PCR 扩增时效果欠佳,长度过短 PCR 效果好但分辨率又会下降。因此,高通量测序技术应用于食性分析,需要结合 DNA 条形码的特性和动物总体食性特征,不同的食性特征要求选择不同的 DNA 条形码或宏条形码(metabarcoding) (表 2)。

高通量测序应用于食性分析,其最大的优势是可将多个 PCR 产物混合起来,在一个测序反应中得到巨量数据。通过对引物两端加上相应的寡核苷酸标签,待测序结束后,在数据分析过程中可根据标签对应到个体。寡核苷酸多聚体的碱基数取决于混样个体数,样品越多,多聚体碱基数越多,但过多会影响PCR效率。一般

表 2 高通量测序用于动物食性分析中常用的 DNA 条形码类型和序列

Table 2 Universal DNA barcoding types and primers in diet analysis using high-throughput sequencing

食物类型 Prey types	小类 Detailed types	DNA 条形码 DNA barcoding	位点 Locus	引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	长度(bp) Length	已验证动物 Studied animals	参考文献 References
脊椎动物 Vertebrata	哺乳类	线粒体	12S V5	12SV5-F: 12SV5-R:	TTAGATACCCCACTATGC TAGAACAGGCTCCTCTAG	100	豹猫(*Prionailurus bengalensis*), 棕熊(*Ursus arctos*)	Shehzed 等[32]; De Barba 等[25]
	两栖类	线粒体	Cytb	RTF RTR	TACAGCCGATACCTCCCTC TTCATGTCTCTTTGTAGAGG	176	蛇类	Brown 等[33]
	鱼类	线粒体	16S	Chord_16S_F Chord16S_R	CGAGAAGACCCTRTGGAGCT CCTNGGTCGCCCCAAC	155	港海豹(*Phoca vitulina*)	Thomas 等[29]
无脊椎动物 Invertebrata	节肢动物	线粒体	COI	ZBJ-ArtF1c ZBJ-ArtR2c	AGATATTGGAACWTTATATTTTATTTTTGG WACTAATCAATTWCCAAATCCTCC	157	食虫蝙类	Burgar 等[37]; Clare 等[28]
	节肢动物	线粒体	16S	IN16STK-1F IN16STK-1R	TGAACTCAGATCATGTAA TTAGGGATAACAGCGTAA	110	沙氏变色蜥(*Anolis sagrei*)	Kartzinel 和 Pringle[26]
无脊椎动物 Invertebrata	软体动物	线粒体	16S	16SMAV-F 16SMAV-R	CCAACATCGAGGTCRYAA ARTTACYNTAGGGATAACAG	36	棕熊(*Ursus arctos*)	De Barba 等[25]
无脊椎动物 Invertebrata	环节动物	线粒体	12S	185F 14233R	TGTGTACTGCCGTCGTAAGCA AAGAGCGACGGGCGATGTGT	230	蛇蜥(*Anguis fragilis*)	Brown 等[33]
植物 Plant	广谱	叶绿体	trnL P6	G H	GGGCAATCCTGAGCCAA CCATTGAGTCTCTGCACCTATC	35-110	白臀叶猴(*Pygathrix nemaeus*), 啮齿类	Srivathsan 等[38]; Lopes 等[24]
	广谱	叶绿体	rbcL	rbcLa-F rbcLa-R	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC GTAAAATCAAGTCCACCRCG	550	蝗虫类	McClenaghan 等[6]
	广谱	叶绿体	rbcL	rbcL-F rbcL-R	CTTACCAGYCTTGATCGTTACAAAGG GTAAAATCAAGTCCACCRCG	379	白尾鹿(*Odocoileus virginianus*)	Erickson 等[22]

采用八聚体,且八聚体间差异应大于 5,即可满足要求[39]。将 PCR 产物等量混合,构建扩增子文库,进行高通量测序。如何筛选高通量测序得到序列,直接关乎后续数据的处理。在此,主要考虑 PCR 和高通量测序产生的冗余序列,可通过相应的程序予以筛选和剔除[26, 32]。

1.3　构建本地潜在食源 DNA 条形码数据库

通过高通量测序平台产生的序列需要与数据库进行比对,才能判断 DNA 序列对应的食物种属[40]。由于动物和植物的地理分布存在很大差异,公共数据库(NCBI,EMBL,DDBJ)仅收录了研究者上传的局部范围内的部分 DNA 条形码,还远远无法满足食性分析研究者的需求[17]。另外,DNA 条形码的种类繁多,分辨率也存在差异。根据动物的食性,需选择不同的 DNA 条形码或 DNA 条形码组合,但公共数据库如果缺乏这种 DNA 条形码数据,将会降低食性分析的分类精度,进而影响食性结果用于濒危动物保护生物学实践。这就要求,研究者需根据研究目的构建基于所选 DNA 条形码的全部本地潜在食源 DNA 条形码数据库。

构建本地 DNA 条形码的步骤:(1) 根据目标动物的活动区域觅食区域,采集潜在食源的组织材料,辅以分类学家的形态学鉴定,从物种水平确定食源种属;(2) 对采集的食源组织材料,提取 DNA,基于食性分析时所选择的 DNA 条形码,合成相应引物,进行 PCR 扩增;(3) 通过 Sanger 测序,构建本地潜在食源 DNA 条形码数据库,供后续高通量测序得出的 DNA 序列进行比对。通过构建本地数据库或者增加 DNA 条形码的种类,能在一定程度上提升分辨率[34],以分析植食性动物为例,构建 rbcL 库可使序列鉴定到种水平的比例达 72%[22]。而未构建地方数据库,鉴定到种的比例显著降低,如在比对蝙蝠食性的高通量数据时,仅有 4%—20%的序列能够鉴定到种或属水平[37]。更为重要的是,本地 DNA 条形码库本身就可直接用于生物多样性的评估和监测[41]。

1.4　高通量测序数据分析

在与建立的本地数据库和公共数据库进行比对时,通过序列相似性判断序列的物种归属,但阈值的设定目前仍然存在争议。一部分研究者采用宽松的相似性阈值来判定种分类阶元,如采用 97%[18, 31],或采用更为严谨的阈值,如采用 99%[37, 42]和 100%[26],也有的建议根据不同的 DNA 条形码和研究目的,采用不同的阈值[25]。对于一些未构建本地数据库的研究,在后续分类归属阶段,虽然可以采取聚类方法,通过分子可操作单位(MOTU,Molecular operational taxonomic units)完成食物组成的差异分析,但总体来说,构建地方数据库将有助于提高序列的分类归属,明确物种具体取食哪种食物,也能推动食性研究结果应用于物种的保护实践[17]。

2　食性分析的应用进展

2.1　食物组成分析

食性研究中,首先需要确定动物的食物组成。通过高通量测序,食物被鉴定出的种类和比例是形态学鉴定无法相比的。Egeter 等[43]利用高通量测序技术对褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、小鼠(*Mus musculus*)和普通刺猬(*Erinaceus europaeus*)摄食蛙的种类进行研究,发现与形态学显微分析相比,高通量测序技术将胃内容物中蛙的检测率从 2%提升到 70%,将粪便中蛙的检测率从 0 提升到 53%。江允中等[44]分析了褐河乌(*Cincluspallasii Temminck*)的食性,发现食物组成涵盖 6 目 8 科 11 属,其中以家蝇科黑蝇属(*Ophyra*)占优势,但由于没有构建本地数据库,近 50%的序列无法鉴定。Brown 等[33]研究了奥地利滑蛇(*Coronella austriaca*),首次发现一些小型哺乳动物也是蛇的主要食物。Leray 等[45]利用高通量测序分析了 3 种鱼的食物组成,检测到 292 个可操作分类单元(Operational taxanomic units, OTUs),其中 51%可鉴定到种水平,另外 26%可鉴定到属水平。高通量测序甚至还用于无脊椎动物的食性,Hambäck 等[46]通过高通量测序技术鉴定了 542 只狼蛛胃内容物的 DNA 组成,发现了 223 个 OTUs,其中 99 个可鉴定到种水平。

2.2　食物对种内和种间关系的影响

食物是动物生存和繁殖所需能量和营养的来源,食物关系则反映了物种间的基本关系。

食性存在物种差异,同域分布的物种为了避免竞争,可能会进化出不同的觅食对策,如选择不同的微生境、取食不同的食物或者在不同的时间觅食,以满足能量和营养需求[47]。食物因子在物种共存和物种竞争中发挥着重要作用[48],而研究食性是探明食物选择机制的前提。对于同一物种,由于雌雄个体承担的繁殖任务不同可能表现出性别差异,甚至由于个性因素而表现出食性的个体差异[49]。Lopes 等[24]通过高通量测序分析和比较了两种栉鼠的食物组成,发现二者食性相差显著,但由于未进行季节性比较,不排除在高能量需求条件下,如繁殖季节,二者存在食物重叠或部分重叠的可能。Soininen 等[50]比较了分布于北极的两种旅鼠的冬季食性,结合高通量数据和食物资源调查数据,发现两种旅鼠食物组成高度重叠,但是该地区丰富的食物能够满足需求,因此种间竞争并不明显。

食性研究为研究行踪隐秘的物种与资源之间的关系提供了新的手段,有助于揭示物种共存和食物重叠的机制。来自蝙蝠的高通量测序食性研究表明,同域分布的两种形态相近的近缘食虫蝙蝠,在主要食物上表现出高度重叠,但在各自的专性食物上却相互分开,证实了食物资源分配是物种共存的机制[51]。Burgar 等[37]随后利用高通量测序又分析了另外 3 种食虫蝙蝠的食性,发现蝙蝠间形态学差异越大,在资源利用方面表现出更显著的异质性,而且这种异质性与生长发育阶段和性别有关。

2.3 食性与行为关系

动物是否迁徙、何时迁徙以及迁徙到何处,除受遗传因素控制外,环境因子如食物也起到了重要作用[52]。迁徙过程对能量需求非常高,动物通过生理、行为和食性变化以适应环境的改变。粪便组织显微鉴定发现纳氏伏翼(*Pipistrellus nathusii*)在秋季迁徙期和夏季居留期食性相似度较高,但分辨率更高的高通量测序结果则显示这两个时期的食性差异较大,夏季以森林昆虫为主,而秋季则以湿地昆虫为主,纳氏伏翼采取了不同的觅食策略以适应当地的食物资源变化[42]。鸟类迁徙前夕,通常会高效地补充能量和营养物质,Bounas 和 Sotiropoulos[53]关于黄爪隼(*Falco naumanni*)的研究证实了这种觅食策略,即黄爪隼通过食谱变窄、频繁觅食和摄取能量更高的直翅目动物来为迁徙做准备。

随着高通量测序技术运用于食性研究,食性分析的精度得以提高,食性定量分析的准确性显著上升,也对一些通过行为学观察或形态学鉴定手段建立的食性理论提出了挑战。最佳觅食理论认为,专食性动物在遇到食物资源减少的情况时,会转向进食一些之前不喜选择的食物,转变为泛食性物种[31]。但是,对水鼠耳蝠(*Myotis daubentonii*)的食性分析发现,即使在冬眠前能量需求大、食物可获得性变小的条件下,也未表现出食谱拓宽的迹象,表明水鼠耳蝠对食物的选择偏好不受时空限制[31]。具有性二型特征的物种,一般在食物资源利用上表现出性别差异,Kartzinel 和 Pringle[26]利用高通量测序技术分析了沙氏变色蜥(*Anolis sagrei*)的食性,发现雌性个体的食物多样性高于雄性。

2.4 捕食者-猎物-环境关系

栖息地为动物提供了所需的食物资源,独特的生态环境可能进化出了特异的食物选择行为,同时栖息地的变化也会导致食物可获得性和食物多样性的变化。食性与栖息地关系的研究为了解动物的觅食策略和栖息地选择提供了依据,高通量测序技术能在较大的空间尺度上高效地分析不同栖息地动物的食性。Clare 等[28]利用高通量测序分析了不同栖息地棕色鼠耳蝠(Myotis *lucifugus*)的食性,结果表明:受污染较轻栖息地内的蝙蝠食物较丰富,提出了蝙蝠的食物质量可作为评价环境质量的一个指标。Trevelline 等[54]对路易斯安那水鸫(*Parkesia motacilla*)通过高通量测序技术进行食性分析,发现水鸫食物中陆生昆虫占比很大,改变了之前认为水鸫偏好污染水生环境中的昆虫的观点。

捕食者、猎物和环境间的关系和相互作用,一直以来是生态学家关注的方向。食草动物可能与自然植物群落的形成和分布关系密切,甚至对外来入侵植物也有影响。Erickson 等[22]通过高通量测序技术分析了白尾鹿(*Odocoileus virginianus*)对本地植物和外来入侵植物的取食偏好,发现白尾鹿选择本地植物作为主要食物,并在一定程度上促进了外来入侵植物的扩张。Khanam 等[19]分析了 3 种啮齿动物的食性,掌握了它们觅食植物和无脊椎动物的种类,为鼠害的生物防控提供了科学依据。

3　高通量测序用于食性分析的影响因素和展望

3.1　PCR 影响

在食性相关的实验研究和理论研究中,高通量测序技术应用越来越普遍,但也存在一些不容忽视的局限性和不确定性[17, 40]。高通量测序技术应用于食性分析主要是基于扩增子测序,模板 DNA 的质量、PCR 和高通量测序技术本身均会单独或交互影响最终结果。无论是以粪便还是以胃内容物和食团作为样品,从中提取的 DNA 均存在不同程度的降解,并含有 PCR 抑制剂,均对 PCR 扩增效率和正确率产生不利影响[55]。另外,为了节约成本,在引物上加上区分个体的标签,也会造成 PCR 错配的发生[56]。PCR 阶段的误差,传递到高通量测序过程,还会被放大,进一步影响最终结果。样品 DNA 中不同 DNA 片段,如果 PCR 效率相差 2%,则导致在 35 个循环后 PCR 产物拷贝数相差 30%[17]。

鉴于高通量测序具有能够在一个测序反应中实现同时测定不同类型食物 DNA 的特点,即将动物和植物的 DNA 条形码置于复合 PCR 中构成宏 DNA 条形码,极大提高了测序效率,降低了测序成本。比如,De Barba 等[25]开发了一种基于宏 DNA 条形码的非损伤性食性分析方法,对棕熊(*Ursus arctos*)的食性进行全面分析,定量分析了棕熊食谱中脊椎动物、无脊椎动物和植物所占的比例。但是,动物和植物 DNA 条形码的引物在 PCR 时,其扩增效率是不一致的,扩增效率高的很可能抑制扩增效率低的,导致 PCR 受到抑制的食物被低估。因此,在高通量测序应用于杂食动物进行复合 PCR 时,很有必要设置阳性对照和重复。

3.2　污染影响

污染是高通量测序应用于食性分析一个不可忽视的误差来源。在采样、样品处理和 PCR 环节,如果存在污染,会在测序过程被灵敏度非常高的高通量测序平台捕获,导致食物多样性被高估或影响食性差异分析结果,比如,在分析埃及獴(*Herpestes ichneumon*)食物的高通量数据时,就发现样品间存在交叉感染[57]。还有一个污染来源属于生态型,即动物在觅食食物后,被更高级别的捕食者取食,在分析更高级别捕食者食性时,就不可避免引入污染,这在食性分析中也是需要特别注意的问题[17],但目前还没有相关研究评估这种二次污染的影响[26]。因此,在分析复杂食物链结构中的物种时,需特别注意二次污染的影响[58]。另外,在分析食肉动物的食性时,使用的 DNA 条形码很可能同时将目标动物的相应片段扩增出来,对后续高通量测序形成干扰和占用测序资源[59],通过设计 blocking oligo 可阻断引物与捕食者的模板 DNA 结合[25]。

3.3　定量分析

相对于食物种类和食物多样性,动物摄取某种食物所占比例以及对食物的偏好选择,是研究者更为关注的问题。基于高通量测序得出食物 DNA 的序列数,是否定量反映了食物被摄取的量和比例,目前仍然存在争议[56]。高通量测序产生的 DNA 序列数较多的食物,有可能被偶尔摄食,而序列数少的却有可能是主要食物或喜好食物[17]。造成这种偏差的原因包括生物因素和技术因素,生物因素:同种食物中不同细胞的 DNA 拷贝数存在差异、食物不同组织所含细胞数不同、动物对每种食物的消化率等;技术因素:对不同食物 DNA 模板的 PCR 扩增效率差异、引物标签引入的误差、PCR 扩增可能发生错配、测序方向、冗余数据剔除参数设置等。这些因素对食性数据的定量化,带来较大困扰。比如,通过企鹅被喂食 4 种鱼的控制实验发现,高通量测序数据与平行进行的定量 PCR 所得数据一致,表明高通量测序的序列数可定量反映摄食量,即 DNA 序列数高的食物,被摄食越多[60]。然而,有关港海豹(*Phoca vitulina*)的研究表明,喂食鱼的比例与高通量测序得出的序列数比例并不相符[56]。

既然基于扩增子测序的食性分析还存在不足,怎样才能让高通量测序技术数据在定性和定量上可靠而又可信呢?在同一个研究中,除了进行高通量测序外,平行开展另一种食性分析方法是验证数据准确性的有效途径。Srivathsan 等[38]采用全基因组 shotgun 方法定量分析了白臀叶猴(*Pygathrix nemaeus*)的食性,该方法不需要 PCR,发现全基因组法比扩增子测序得出了更高的食物多样性,但通过比较分析,也验证了扩增子测序法在相对定量上是可信的。值得注意的是,有关白尾鹿(*Odocoileus virginianus*)的研究却发现全基因组法得出

的食物多样性明显偏低,大部分序列为微生物,相反扩增子测序法准确性更高[22]。

采用高通量测序技术分析食性,其数据量和将食物鉴定到种水平的特点,是其他食性分析方法所不具备的。由于该技术应用于食性分析才刚刚兴起,一些技术细节和影响因素仍需注意。随着高通量测序技术逐渐成熟和稳定,以及研究者对误差因素的重视和控制,该技术将得到更广泛和更深入的应用。目前,世界上绝大多数动物的食性,现在还处于较为粗略的定性描述阶段,随着高通量测序技术成本降低,期待更多的动物学家利用该技术分析食性,整合食性结果去解释一些更加复杂但又富有意义的问题,比如,探讨动物对植物的采食与植物授粉和种子扩散生态过程的关系,确定哪些植物的授粉过程需要哪种动物的介导,定位动物在食物网结构中扮演的生态角色[61];研究气候变化对动物食性偏好和转变的影响,预测动物喜食食物受气候变化的影响,模拟动物如何通过转变食性以适应全球变暖[62];高通量测序技术与其他技术手段联合,将为食性分析的应用开启更广阔的空间。高通量测序在确定食物种类和差异上独具优势,而稳定同位素能够分析食物的来源和能量流动,两种方法相辅相成,对复杂食物网的研究具有重要应用前景[46]。随着高通量测序技术在定量分析食性方面日渐成熟,有助于联合营养几何学深入探讨动物的营养需求和觅食策略[63]。

参考文献(References):

[1] Duffy J E, Cardinale B J, France K E, McIntyre P B, Thébault E, Loreau M. The functional role of biodiversity in ecosystems: incorporating trophic complexity. Ecology Letters, 2007, 10(6): 522-538.

[2] Sheppard S K, Harwood J D. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food-webs. Functional Ecology, 2005, 19(5): 751-762.

[3] Aryal A, Panthi S, Barraclough R K, Bencini R, Adhikari B, Ji W H, Raubenheimer D. Habitat selection and feeding ecology of dhole (*Cuon alpinus*) in the Himalayas. Journal of Mammalogy, 2015, 96(1): 47-53.

[4] Severud W J, Windels S K, Belant J L, Bruggink J G. The role of forage availability on diet choice and body condition in American beavers (*Castor canadensis*). Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde, 2013, 78(2): 87-93.

[5] 郑荣泉, 鲍毅新. 有蹄类食性研究方法及研究进展. 生态学报, 2004, 24(7): 1532-1539.

[6] 邢廷杰, 王勇, 邓武军, 张美文, 李波, 朱俊霞. 蛋白质, 纤维素和单宁酸对东方田鼠摄食的影响. 生态学报, 2010, 30(4): 941-948.

[7] Rothwell N J, Stock M J. The cafeteria diet as a tool for studies of thermogenesis. Journal of Nutrition, 1988, 118(8): 925-928.

[8] 郑光美, 赵欣如, 宋杰, 刘宗行, 周洪青. 黄腹角雉的食性研究. 生态学报, 1986, 6(3): 283-288.

[9] 武正军, 李义明, 王彦平. 洗胃法与剖胃法在四种蛙食性分析中的对比. 动物学报(Current Zoology), 2007, 53(2):364-372.

[10] Holechek J L, Gross B, Dabo S M, Stephenson T. Effects of sample preparation, growth stage, and observer on microhistological analysis of herbivore diets. Journal of Wildlife Management, 1982, 46(2): 502-505.

[11] 孙泽威, 邓波, 娄玉杰, 周道玮. 饱和链烷烃技术测定放牧动物营养状况的几个关键问题. 草地学报, 2012, 20(3): 389-392.

[12] Kaneko H, Lawler I R. Can near infrared spectroscopy be used to improve assessment of marine mammal diets *via* fecal analysis? Marine Mammal Science, 2006, 22(2): 261-275.

[13] Heroldova M, Cizmar D, Tkadlec E. Predicting rodent impact in crop fields by near-infrared reflectance spectroscopy analysis of their diet preferences. Crop Protection, 2010, 29(7): 773-776.

[14] 王玄, 江红星, 张亚楠. 稳定同位素分析在鸟类食性及营养级结构中的应用. 生态学报, 2015, 35(16): 5556-5569.

[15] 郑新庆, 王倩, 黄凌风, 王建佳, 林荣澄, 黄丁勇, 孙晓红. 基于碳、氮稳定同位素的厦门筼筜湖两种优势端足类食性分析. 生态学报, 2015, 35(23): 7589-7597.

[16] Braley M, Goldsworthy S D, Page B, Steer M, Austin J J. Assessing morphological and DNA-based diet analysis techniques in a generalist predator, the arrow squid *Nototodarus gouldi*. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 466-474.

[17] Pompanon F, Deagle B E, Symondson W O, Brown D S, Jarman S N, Taberlet P. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1931-1950.

[18] Mcclenaghan B, Gibson J F, Shokralla S, Hajibabaei M. Discrimination of grasshopper (Orthoptera: Acrididae) diet and niche overlap using next-generation sequencing of gut contents. Ecology and Evolution, 2015, 5(15): 3046-3055.

[19] Khanam S, Howitt R, Mushtaq M, Russell J C. Diet analysis of small mammal pests: a comparison of molecular and microhistological methods. Integrative Zoology, 2016, 11(2): 98-110.

[20] Oehm J, Thalinger B, Eisenkölbl S, Traugott M. Diet analysis in piscivorous birds: What can the addition of molecular tools offer? Ecology and

Evolution, 2017, 7(6): 1984-1995.

[21] Waits L P, Paetkau D. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. Journal of Wildlife Management, 2005, 69(4): 1419-1433.

[22] Erickson D L, Reed E, Ramachandran P, Bourg N A, McShea W J, Ottesen A. Reconstructing a herbivore's diet using a novel *rbc*L DNA mini-barcode for plants. AoB Plants, 2017, 9(3): plx015.

[23] Liu G, Zang S, Li L H, Hu X L, Zhao S S, Li K, Hu D F. Evaluation of fecal DNA preservation and extraction methods in Przewalski's horse. Conservation Genetics Resources, 2014, 6(3): 511-513.

[24] Lopes C M, De Barba M, Boyer F, Mercier C, Da Silva Filho P J S, Heidtmann L M, Galiano D, Kubiak B B, Langone P, Garcias F M, Gielly L, Coissac E, de Freitas T R O, Taberlet P. DNA metabarcoding diet analysis for species with parapatric vs sympatric distribution: a case study on subterranean rodents. Heredity, 2015, 114(5): 525-536.

[25] De Barba M, Miquel C, Boyer F, Mercier C, Rioux D, Coissac E, Taberlet P. DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(2): 306-323.

[26] Kartzinel T R, Pringle R M. Molecular detection of invertebrate prey in vertebrate diets: trophic ecology of Caribbean island lizards. Molecular Ecology Resources, 2015, 15(4): 903-914.

[27] Bohmann K, Monadjem A, Noer C L, Rasmussen M, Zeale M R K, Clare E, Jones G, Willerslev E, Gilbert M T P. Molecular diet analysis of two african free-tailed bats (molossidae) using high throughput sequencing. PLoS One, 2011, 6(6): e21441.

[28] Clare E L, Symondson W O, Broders H, Fabianek F, Fraser E E, Mackenzie A, Boughen A, Hamilton R, Willis C K, Martinez-Nuñez F, Menzies A K, Norquay K J O, Brigham M, Poissant J, Rintoul J, Barclay R M R, Reimer J P. The diet of *Myotis lucifugus* across Canada: assessing foraging quality and diet variability. Molecular Ecology, 2014, 23(15): 3618-3632.

[29] Thomas A C, Jarman S N, Haman K H, Trites A W, Deagle B E. Improving accuracy of DNA diet estimates using food tissue control materials and an evaluation of proxies for digestion bias. Molecular Ecology, 2014, 23(15): 3706-3718.

[30] Liu G, Hu X L, Shafer A B A, Gong M H, Han M, Yu C J, Zhou J Y, Bai J, Meng D R, Yu G H, Dang D P. Genetic structure and population history of wintering Asian Great Bustard (*Otis tarda dybowskii*) in China: implications for conservation. Journal of Ornithology, 2017, 158(3): 761-772.

[31] Vesterinen E J, Ruokolainen L, Wahlberg N, Peña C, Roslin T, Laine V N, Vasko V, Sääksjärvi I E, Norrdahl K, Lilley T M. What you need is what you eat? Prey selection by the bat *Myotis daubentonii*. Molecular Ecology, 2016, 25(7): 1581-1594.

[32] Shehzad W, Riaz T, Nawaz M A, Miquel C, Poillot C, Shah S A, Pompanon F, Coissac E, Taberlet P. Carnivore diet analysis based on next - generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1951-1965.

[33] Brown D S, Ebenezer K L, Symondson W O C. Molecular analysis of the diets of snakes: changes in prey exploitation during development of the rare smooth snake *Coronella austriaca*. Molecular Ecology, 2014, 23(15): 3734-3743.

[34] Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. DNA barcoding for ecologists. Trends in Ecology & Evolution, 2009, 24(2): 110-117.

[35] Oehm J, Juen A, Nagiller K, Neuhauser S, Traugott M. Molecular scatology: how to improve prey DNA detection success in avian faeces? Molecular Ecology Resources, 2011, 11(4): 620-628.

[36] Jedlicka J A, Sharma A M, Almeida R P P. Molecular tools reveal diets of insectivorous birds from predator fecal matter. Conservation Genetics Resources, 2013, 5(3): 879-885.

[37] Burgar J M, Murray D C, Craig M D, Haile J, Houston J, Stokes V, Bunce M. Who's for dinner? High - throughput sequencing reveals bat dietary differentiation in a biodiversity hotspot where prey taxonomy is largely undescribed. Molecular Ecology, 2014, 23(15): 3605-3617.

[38] Srivathsan A, Sha J C M, Vogler A P, Meier R. Comparing the effectiveness of metagenomics and metabarcoding for diet analysis of a leaf - feeding monkey (*Pygathrix nemaeus*). Molecular Ecology Resources, 2015, 15(2): 250-261.

[39] Coissac E. OligoTag: a program for designing sets of tags for next-generation sequencing of multiplexed samples//Pompanon F, Bonin A, eds. Data Production and Analysis in Population Genomics: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Totowa, NJ: Humana Press, 2012: 13-31.

[40] Soininen E M, Valentini A, Coissac E, Miquel C, Gielly L, Brochmann C, Brysting A K, Sønstebø J H, Ims R A, Yoccoz N G, Taberlet P. Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures. Frontiers in Zoology, 2009, 6: 16.

[41] Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough T G, Savolainen V. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(8): 2923-2928.

[42] Krüger F, Clare E L, Symondson W O C, Keišs O, Pētersons G. Diet of the insectivorous bat *Pipistrellus nathusii* during autumn migration and summer residence. Molecular Ecology, 2014, 23(15): 3672-3683.

[43] Egeter B, Bishop P J, Robertson B C. Detecting frogs as prey in the diets of introduced mammals: a comparison between morphological and DNA-based diet analyses. Molecular Ecology Resources, 2015, 15(2): 306-316.

[44] 江允中, 丘明智, 洪孝宇, 孙元勋. 郭美华. 应用次世代定序分析褐河乌(*Cinclus pallasii* Temminck, 1820)粪便残存 DNA 探讨其非繁殖季之食性. 台湾昆虫, 2015, 35(4): 213-226.

[45] Leray M, Meyer C P, Mills S C. Metabarcoding dietary analysis of coral dwelling predatory fish demonstrates the minor contribution of coral mutualists to their highly partitioned, generalist diet. PeerJ, 2015, 3: e1047.

[46] Hambäck P A, Weingartner E, Dalén L, Wirta H, Roslin T. Spatial subsidies in spider diets vary with shoreline structure: complementary evidence from molecular diet analysis and stable isotopes. Ecology and Evolution, 2016, 6(23): 8431-8439.

[47] Schmitt R J, Coyer J A. Variation in surfperch diets between allopatry and sympatry: circumstantial evidence for competition. Oecologia, 1983, 58(3): 402-410.

[48] Chesson P. Mechanisms of maintenance of species diversity. Annual Review of Ecology and Systematics, 2000, 31: 343-366.

[49] Weimerskirch H, Cherel Y, Cuenot-Chaillet F, Ridoux V. Alternative foraging strategies and resource allocation by male and female wandering albatrosses. Ecology, 1997, 78(7): 2051-2063.

[50] Soininen E M, Gauthier G, Bilodeau F, Berteaux D, Gielly L, Taberlet P, Gussarova G, Bellemain E, Hassel K, Stenøien H K, Epp L, Schrøder-Nielsen A, Brochmann C, Yoccoz N G. Highly overlapping winter diet in two sympatric lemming species revealed by DNA metabarcoding. PLoS One, 2015, 10(1): e0115335.

[51] Razgour O, Clare E L, Zeale M R K, Hanmer J, Schnell I B, Rasmussen M, Gilbert T P, Jones G. High-throughput sequencing offers insight into mechanisms of resource partitioning in cryptic bat species. Ecology and Evolution, 2011, 1(4): 556-570.

[52] Olsson I C, Greenberg L A, Bergman E, Wysujack K. Environmentally induced migration: the importance of food. Ecology Letters, 2006, 9(6): 645-651.

[53] Bounas A, Sotiropoulos K. Change of feeding strategy prior to migration: a comparative diet analysis in the Lesser Kestrel (*Falco naumanni*). Avian Biology Research, 2017, 10(1): 27-35.

[54] Trevelline B K, Latta S C, Marshall L C, Nuttle T, Porter B A. Molecular analysis of nestling diet in a long-distance Neotropical migrant, the Louisiana Waterthrush (*Parkesia motacilla*). The Auk: Ornithological Advances, 2016, 133(3): 415-428.

[55] Broquet T, Ménard N, Petit E. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. Conservation Genetics, 2007, 8(1): 249-260.

[56] Deagle B E, Thomas A C, Shaffer A K, Trites A W, Jarman S N. Quantifying sequence proportions in a DNA - based diet study using Ion Torrent amplicon sequencing: which counts count? Molecular Ecology Resources, 2013, 13(4): 620-633.

[57] Santos T, Fonseca C, Barros T, Godinho R, Bastos-Silveira C, Bandeira V, Rocha R G. Using stomach contents for diet analysis of carnivores through DNA barcoding. Wildlife Biology in Practice, 2015, 11(1): 47-55.

[58] Bowser A K, Diamond A W, Addison J A. From puffins to plankton: a DNA-based analysis of a seabird food chain in the northern Gulf of Maine. PLoS One, 2013, 8(12): e83152.

[59] Leray M, Yang J Y, Meyer C P, Mills S C, Agudelo N, t Ranwez V, Boehm J T, Machida R J. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. Frontiers in Zoology, 2013, 10: 34.

[60] Murray D C, Bunce M, Cannell B L, Oliver R, Houston J, White N E, Barrero R A, Bellgard M I, Haile J. DNA-based faecal dietary analysis: a comparison of qPCR and high throughput sequencing approaches. PLoS One, 2011, 6(10): e25776.

[61] Valiente-Banuet A, Aizen M A, Alcántara J M, Arroyo J, Cocucci A, Galetti M, García M B, García D, Gómez J M, Jordano P, Medel R, Navarro L, Obeso J R, Oviedo R, Ramírez N, Rey P J, Traveset A, Verdú M, Zamora R. Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. Functional Ecology, 2015, 29(3): 299-307.

[62] Carreira B M, Segurado P, Orizaola G, Gonçalves N, Pinto V, Laurila A, Rebelo R. Warm vegetarians? Heat waves and diet shifts in tadpoles. Ecology, 2016, 97(11): 2964-2974.

[63] Nie Y G, Speakman J R, Wu Q, Zhang C L, Hu Y B, Xia M H, Yan L, Hambly C, Wang L, Wei W, Zhang J G, Wei F W. Exceptionally low daily energy expenditure in the bamboo-eating giant panda. Science, 2015, 349(6244): 171-174.